

内皮细胞脂质过氧化损伤增强主动脉 平滑肌细胞表达细胞周期素 D

王国平 倪娟 夏春枝 邓仲端

(同济医科大学病理学教研室, 武汉 430030)

Lipid Peroxidation Injury to Endothelial Cell Enhanced Expression of Cyclin D in Aortic Smooth Muscle Cells

WANG Guo-Ping, NI Juan, XIA Chun-Zhi and DENG Zhong-Duan

(Department of Pathology, Tongji Medical University, Wuhan 430030, China)

ABSTRACT

Aim The purpose of the study is to well understand expression of cyclin D in smooth muscle cells and its association with lipid peroxidation injury to endothelial cells.

Methods The lipid peroxidation injury to cultured endothelial cells was induced by diamide, then diamide stimulating endothelial cell-derived conditioned media were collected. After a 24-hour culture of smooth muscle cells exposed to various epithelial cell derived conditioned media, smooth muscle cells were collected, and used to immunocytochemistry staining and proliferative test.

Results Rabbit smooth muscle cells could express cyclin D, the reactant of immune reaction was mainly located in nuclei. The media conditioned by diamide stimulating endothelial cells induced stronger expression of cyclin D in smooth muscle cells ($P < 0.01$).

Meanwhile the amount of ^3H -TdR incorporation into DNA in smooth muscle cells induced by the media was obvious larger than that induced by normal endothelial cell derived conditioned media ($P < 0.01$).

Conclusion The proliferation of smooth muscle cells is related to expression of cyclin D, lipid peroxidation injury to endothelial cell may induce proliferation of smooth muscle cells through enhancing expression of cyclin D.

tion of smooth muscle cells through enhancing expression of cyclin D.

KEY WORDS Cyclin D; Smooth muscle cell; Endothelial cell; Lipidoxidation injury; Atherosclerosis

摘要 为探讨细胞周期素 D 在主动脉平滑肌细胞中的表达规律,揭示动脉粥样硬化中平滑肌细胞的增殖机制,在培养的兔主动脉平滑肌细胞中分别加入不同程度的内皮细胞损伤后的条件培养基,24 h 后分别收集各组的平滑肌细胞,进行免疫组织化学染色和细胞核的增殖试验。结果发现,主动脉平滑肌细胞可表达细胞周期素 D,其免疫反应产物主要位于细胞核内。内皮细胞损伤后的条件培养基能明显促进平滑肌细胞表达细胞周期素 D,同时细胞核增殖实验显示,该条件培养基亦能促进平滑肌细胞的增殖。以上结果提示主动脉平滑肌细胞的增殖与细胞周期素 D 的表达密切相关,损伤后的内皮细胞可通过促进血管平滑肌细胞表达细胞周期素 D 而诱导平滑肌细胞增殖。

关键词 细胞周期素 D; 平滑肌细胞; 内皮细胞; 脂质过氧化损伤; 动脉粥样硬化

细胞周期素 D(cyclin D)特异性地表达于细胞增殖周期的 G1 期,并调控着 G0 期细胞向 G1 期转化^[1],它被认为是细胞增殖周期启动的重要调控因子。因此研究细胞周期素 D 在细胞增殖周期中的表达规律及其影响因素对于探讨以细胞增殖为基础的疾病的发生发展过程具有极为重要的意义。

血管中膜平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)迁入内膜并增殖既是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发病机制的中心环节,也是 As 发展过程中极为重要的事件。它在 As 斑

块的发生进展及消退中起着重要的作用,但其机理颇为复杂。因此研究 SMC 的增殖规律对于明了 As 发病机制具有重要意义^[2]。近年研究表明,内皮细胞的脂质过氧化损伤与 As 发生的关系甚为密切,内皮细胞的脂质过氧化损伤可刺激 SMC 增殖^[3],但对其更详细的机理目前尚不清楚。本文试图从细胞周期素的调控方面对这一问题作更进一步的研究。

1 材料与方法

1.1 血管平滑肌细胞的培养与鉴定

取 4~6 周龄家兔的主动脉中膜 SMC 进行培养。原代培养采用贴块法^[4],待细胞长满瓶底,用胰蛋白酶加 EDTA 消化传代。常规培养用含 10% 胎牛血清的 M199 培养基(GIBCO 公司)。当第 4 代 SMC 基本上融合时,常规消化法取出细胞。倒置相差显微镜下,SMC 呈典型“峰与谷”结构。

1.2 血管内皮细胞的培养及损伤

在牛主动脉内注满 0.25% 胰蛋白酶(DIFCO 公司),37℃ 消化 15 min 左右,用含 10% 小牛血清的 M199 培养基终止反应,磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution, PBS)洗涤,收集消化液和冲洗液,制成细胞悬液,离心 1 000 r/min 10 min,弃上清,在沉淀中加入含 10% 胎牛血清的 M199 培养基(GIBCO 公司),轻轻吹打均匀,分种于培养瓶内,37℃ 5%CO₂ 培养箱内静置培养 2 天,以后隔天换液一次^[5]。

取正常融合状态的内皮细胞(endothelial cell, EC),弃去培养基, PBS 洗涤 2 次,加入含 0.6×10^4 mol/L 联胺的无血清 DME/F-12 混合培养基,分别于 1 h、2 h 和 4 h 后弃去原培养基,然后分别加入不含联胺的无血清培养基,24 h 后,收集该条件培养基即为联胺作用后 1 h、2 h 和 4 h 的内皮细胞条件培养基。

1.3 平滑肌细胞有丝分裂试验

取生长状态良好的平滑肌细胞,消化后加含 10% 胎牛血清的 M199 培养基,调细胞浓度为 7×10^3 个/L,分种于 96 孔板,每孔 200 μ L,培养 6 h 后 PBS 洗涤,加无血清 DME/F-12 混合培养基 30 h 使细胞周期处在同步状态,弃去培养基, PBS 洗涤,分别加入正常及联胺作用后不同时间的内皮细胞条件培养基,阴性对照组加入无血清的 DME/F-12 混合培养基,培养 10 h 后,加 ³H-TdR 使每孔终浓度为 0.5 μ ci/孔,继续培养 20 h,弃去培养基,每孔加 0.1 mol/L NaOH 200 μ L, 30

min 后将每孔溶液全部吸入盛有 7 mL 闪烁液(二甲苯: Triton=2:1, 0.4% 2,5-二苯基噁唑)的闪烁杯中,用液体闪烁计数器(FJ-210TG)检测其放射性活度^[6]。

1.4 免疫组织化学染色

终止培养,取出有平滑肌细胞的盖玻片,冷丙酮固定 15 min,用 LAB-SA 方法进行免疫组织化学染色。第一抗体为抗细胞周期素 D 抗体(Santa Cruz 公司, 1:1000),第二抗体为生物素标记的羊抗鼠 IgG(1:100, 北京中山生物技术公司),第三抗体为酶标 SP(1:100, 北京中山生物技术公司),最后用 DAB/H₂O₂ 显色。

1.5 图像分析处理

用 TJTY-300 型医用图像处理系统检测细胞周期素 D 在不同的条件下表达的吸光度(A)。然后用 Student-Test 进行统计学分析处理。

2 结果

2.1 形态学结果

细胞周期素 D 在正常 SMC 有低度表达,处于对数生长期的细胞表达细胞周期素 D 强于融合期细胞。它的免疫反应产物多位于细胞核内,较少见于细胞浆内。正常内皮细胞条件培养基作用于 SMC 后,细胞周期素 D 在 SMC 中的表达增强。用联胺作用 1 h 的内皮细胞条件培养基培养 SMC 24 h 后,SMC 高度地表达细胞周期素 D(图 1 和图 2, Figure 1 and 2)。

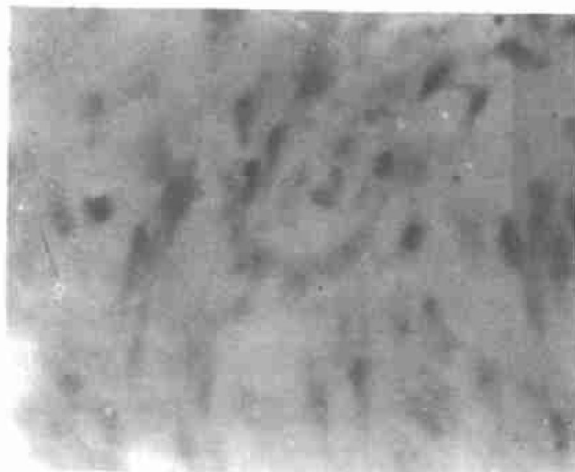


Figure 1. Cyclin D expression in smooth muscle cells exposed to normal cell conditioned medium.

2.2 联胺作用后的内皮细胞条件培养基使平滑肌细胞增殖增强

正常融合的内皮细胞条件培养基作用于 SMC 24 h 后, ^3H -TdR 掺入 SMC 的 DNA 量为 $1\,136 \pm 28$, 联胺作用后 1 h、2 h 和 4 h 的条件培养基作用于 SMC 24 h 后, ^3H -TdR 掺入 SMC DNA 的量分别为 $1\,880 \pm 152$ 、 $1\,350 \pm 80$ 和 $1\,301 \pm 64$, 明显地高于正常对照组, 统计学分析显示, 其差异均有极显著性意义 ($P < 0.01$; 表 1, Table 1)。

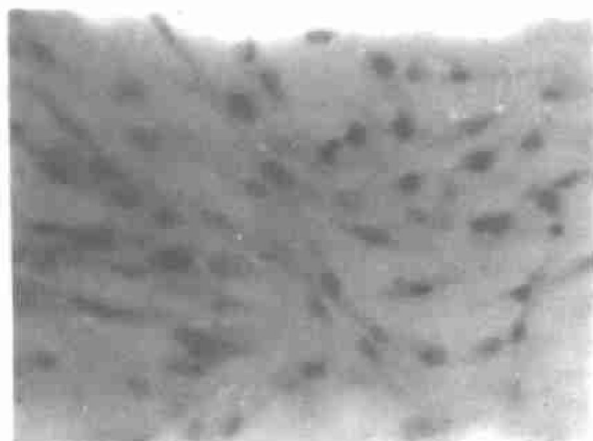


Figure 2. Cyclin D expression in smooth muscle cells exposed to media conditioned by diamide stimulating endothelial cell for 1 hour.

Table 1. The effect of various endothelial cell conditioned media on the incorporation of ^3H -TdR into SMC DNA ($\bar{x} \pm s$).

Groups	n	^3H -TdR incorporation (cpm)
EC-CM	6	$1\,136 \pm 28$
1DEC-CM	6	$1\,880 \pm 152^a$
2DEC-CM	6	$1\,350 \pm 80^a$
4DEC-CM	6	$1\,301 \pm 64^a$

EC-CM: EC derived conditioned media; 1DEC-CM, 2DEC-CM and 4DEC-CM represents EC derived conditioned medium when EC exposed to diamide for 1, 2 and 4 hours, respectively. a: $P < 0.01$, compared with EC-CM group.

2.3 联胺作用后的内皮细胞条件培养基使平滑肌细胞表达细胞周期素 D 增强

正常内皮细胞条件培养基作用于 SMC 后, 细胞周期素 D 在 SMC 表达的吸光度为 0.213 ± 0.03 , 联胺作用 1 h、2 h 和 4 h 后的内皮细胞

条件培养基分别作用于 SMC 24 h 后, SMC 表达细胞周期素 D 的吸光度分别为 0.377 ± 0.04 、 0.339 ± 0.03 和 0.296 ± 0.03 , 后三者与前者相比, 其差异均具有极显著性意义 ($P < 0.01$; 表 2, Table 2)。

Table 2. The expression of cyclin D.

Groups	n	absorbance(A)
EC-CM	30	0.213 ± 0.03
1DEC-CM	30	0.373 ± 0.04^a
2DEC-CM	30	0.339 ± 0.03^a
4DEC-CM	30	0.296 ± 0.03^a

EC-CM: EC derived conditioned media; 1DEC-CM, 2DEC-CM and 4DEC-CM represents EC derived conditioned medium when EC exposed to diamide for 1 hour, 2 and 4 hours respectively. a: $P < 0.01$, compared with EC-CM group.

3 讨论

血管中膜 SMC 迁入内膜并增殖是 As 发病机制的中心环节。SMC 的增生是 As 发生发展过程中的极为重要的事件。因此研究血管 SMC 的增殖规律对于明了 As 的发病机制具有极为重要的意义。一定浓度的联胺可使内皮细胞脂质过氧化损伤, 并与 As 的发生有密切关系^[6]。而细胞周期素 D 在主动脉 SMC 中的表达规律还未明了。有关内皮细胞损伤后的条件培养基对 SMC 表达细胞周期素 D 的影响, 还未见文献报道。

本文着眼于 As 的发病机制, 探讨内皮细胞损伤后对 SMC 增殖的调控规律。As 发病过程中, 在一些致病因素的作用下, 内皮细胞受到损伤后, 可通过分泌一些细胞因子影响动脉壁内其它的一些细胞生物学功能, 从而加快了 As 的发生和发展。本研究结果表明, SMC 的增殖受到自身细胞周期素 D 的调控, 而内皮细胞损伤后的条件培养基能明显地促进 SMC 细胞周期素 D 的表达, 尤以损伤 1 h 后的内皮细胞条件培养基的作用最显著。提示内皮细胞损伤后可分泌某种因子通过促进 SMC 细胞周期素 D 的

表达而增强 SMC 的增殖能力。在我们的实验中还观察到一些促进 SMC 增殖的因子如 PDGF 和内毒素等,也促进了 SMC 细胞周期素 D 的表达(资料将在另一篇论文中显示),提示 SMC 的增殖受到细胞周期素 D 的调控。因此,控制细胞周期素 D 的表达,对于调控 SMC 的增殖具有特别重要的意义。这无疑为明了 As 过程中 SMC 的增殖规律提供了新的理论和实验途径。

参考文献

- 1 Sherr CJ. G1 phase progression: Cyclin on cue. *Cell*, 1994, 79: 551~555.
- 2 Nichols K, Krantis A, Stains W, et al. Histochemical location of nitric oxide-synthesizing neurons and vascular site in the guinea-pig intestine. *Neuroscience*, 1992, 51 (4): 791~799.
- 3 夏春枝, 邓仲端, 李丽珠, 等. 内皮细胞脂质过氧化损伤与平滑肌细胞增殖的关系. *中国动脉硬化杂志*, 1996, 4 (3): 181~184.
- 4 邓仲端, 邱红明, 瞿智玲, 等. 巨噬细胞源性趋化因子所致的平滑肌细胞迁移. *中华病理学杂志*, 1993, 22 (3): 163.
- 5 王国平, 邓仲端, 瞿智玲. 氧化修饰的低密度脂蛋白和极低密度脂蛋白对单核细胞 PDGF-B 表达的影响. *中国动脉硬化杂志*, 1995, 3 (3): 221~223.
- 6 陈铁镇, 董玉兰. 内皮细胞脂质过氧化损伤与动脉粥样硬化. *电子显微学报*, 1991, 4: 394.

(1997-06-29 收到, 1997-08-18 修回)

名词术语的汉英对照及缩写(I)

巨细胞病毒	cytomegalovirus, CMV
单核-巨噬细胞	mononuclear macrophage, MNM
单核苷酸	mononucleotide, MN
单核蛋白体	monosome, MS
单核吞噬细胞系统	mononuclear phagocyte system, MPS
单核细胞	mononuclear leukocyte, ML
单核细胞	mononuclear cell, MC
单核细胞生成	monocytopoiesis, MCP
单核细胞系	monocytic series, MS
单核样网状细胞	mononuclear reticular cell, MRC
单核样组织细胞	mononuclear histocyte, MHC
单基因遗传	monogenic inheritance
单价抗血清	monovalent antiserum
单价染色体	monovalent chromosome
单抗原决定簇	epitope